



(51) МПК

A61K 35/26 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005132190/15, 18.10.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.10.2005

(45) Опубликовано: 27.03.2007 Бюл. № 9

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2149006 C1, 20.05.2000. SU 1112606
A1, 20.08.1996. SU 1218521 A1, 30.06.1994. GB
2177402 A1, 21.01.1987. FR 2583982 A1,
02.01.1987. EP 0080518 A1, 08.06.1983.

Адрес для переписки:

129323, Москва, Лазоревый пр-д, 4-59, Т.Г.
Гайворонской

(72) Автор(ы):

Исаев Вячеслав Арташесович (RU),
Хлюстов Владимир Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

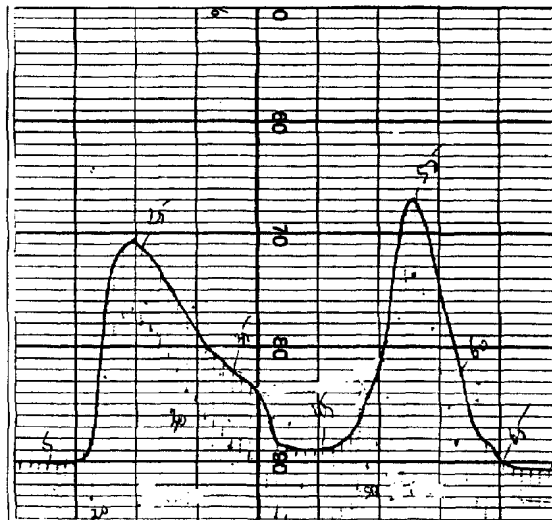
Закрытое Акционерное Общество Научно-
производственное предприятие "Тринита" (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОСТИМУЛЯТОРА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и может быть использовано при выделении гормональных веществ с биологической активностью в иммунологических процессах, в частности при получении иммуностимулятора «Тимозин Т». Способ заключается в том, что вилочковую железу телят 1-2 месячного возраста, гомогенизируют в дистиллированной воде в течение 5-6 мин при 8000 об/мин гомогенизатора, обрабатывают сернокислым аммонием из расчета 1:3-3,5 по объему до 50% насыщения, подкисляют супернатант пропусканием углекислого газа, растворяют осадок после подкисления и центрифугирования в дистиллированной воде до насыщенного состояния раствора, пропускают через хроматографическую колонку с сефадексом G-50, уравновешенную дистиллированной водой. При этом все операции центрифугирования ведут в течение не более 15 мин при 3000 об/мин. Изобретение обеспечивает повышение выхода иммуностимулятора с высокой биологической активностью, расширение сферы его применения

упрощение процесса. 1 з.п. ф-лы., 5 ил., 3 табл.



1-пик

Фиг. 1

II пик



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 35/26 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2005132190/15, 18.10.2005

(24) Effective date for property rights: 18.10.2005

(45) Date of publication: 27.03.2007 Bull. 9

Mail address:

129323, Moskva, Lazorevyy pr-d, 4-59, T.G.
Gajvoronskoj

(72) Inventor(s):

Isaev Vjacheslav Artashesovich (RU),
Khijustov Vladimir Nikolaevich (RU)

(73) Proprietor(s):

Zakrytoe Aktsionernoe Obshchestvo Nauchno-
proizvodstvennoe predpriyatje "Trinita" (RU)

(54) METHOD FOR PRODUCING IMMUNOSTIMULATOR

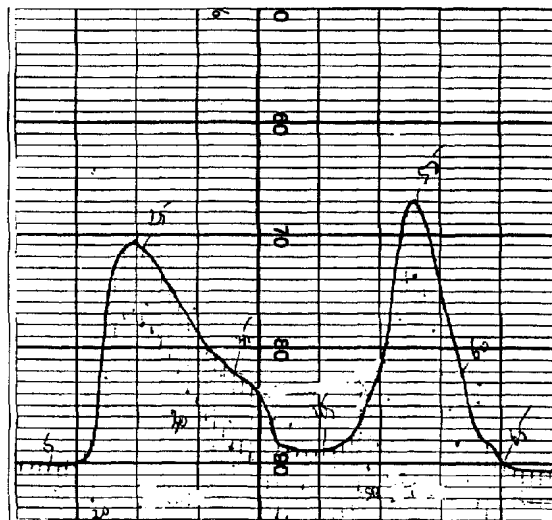
(57) Abstract:

FIELD: medical engineering.

SUBSTANCE: method involves homogenizing 1-2 months old seal thymus in distilled water within 5-6 minutes at 8000 rpm, treating it with ammonium sulfate in 1:3-3.5 proportions by volume to reach saturation of 50%. The supernatant is acidified by bubbling carbonic gas. The deposit is dissolved after acidifying and centrifuging it in distilled water to reach saturated solution condition, forced through chromatographic column with Sephadex G-50 counterbalanced with distilled water. Centrifuging operations last not longer than 15 min, at 3000 rpm.

EFFECT: increased immunostimulator output; high biological activity; wide range of functional applications; simplified process.

2 cl, 5 dwg, 3 tbl



1-пик

П пик

Фиг. 1

Изобретение относится к медицине и может быть использовано при выделении гормональных веществ с биологической активностью в иммунологических процессах, в частности при получении иммуностимулятора «Тимозин Т».

Препараты, которые могут быть использованы для стимулирования иммунного ответа, например, у животных продуцентов, сельскохозяйственных животных и человека, для производства иммунных сывороток, могут быть получены, в частности:

- из органов и тканей крупного рогатого скота [пат. РФ 2089204, А 61 К 35/48, опубл. 1997.09.10.]
- из молока лососевых рыб [патент РФ №2091073, А 61 К 35/60, опубл. 1997.09.27],
- из нервной ткани морских гидробионтов [патент РФ №2222337, А 61 К 35/60, 2004.01.27].

В качестве сырья используют обезжиренную и депигментированную биомассу *Spirulina platensis* [пат. РФ 2125464, А 61 К 35/80, 1999.01.27], ганглии кальмара [патент РФ 2091072, А 61 К 35/50, 1997.09.27], и даже миндалины человека [пат. РФ №1522485, А 61 К 35/30, 1994.11.15].

Известен способ выделения иммуностимулятора - «Тимозина», согласно которому свежий тимус крупного рогатого скота, взятый со льда, гомогенизируют в физрастворе, а затем центрифугируют. Надосадочную жидкость собирают и нагревают до 80°C и после удаления осадка фильтруют через мелкоячеистые фильтры (0,45 м), после обработки ацетоном, фильтрования к повторного осаждения при помощи (NH₄)₂SO₄ при pH 4,0, пропускают через хроматографическую колонку и получают чистый тимозин (5-я фракция) [Golstein A., Guna A., Zatz M., Hardi M., White A., "Purification and biological activity of the timus gland", Proc. Natl. Acad. USA, 69, 1800, 1972].

Аналогично описанному выше выделяют иммуностимулятор из тимуса телят или молодняка рогатого скота, где после очистки сырья его замораживают и измельченное сырье экстрагируют 5-6 объемами 3%-ного раствора уксусной кислоты, содержащего хлористый цинк при соотношении хлористого цинка и уксусной кислоты 1:1000 в течение 48-72 ч, затем отделяют надосадочную жидкость и выделяют целевой продукт осаждением пятью объемами ацетона при t=(-3)-(-5)°C. Полученный осадок экстрагируют водой при pH 6-7 и комнатной температуре в течение 1-3 ч. [Патент РФ 1112606, кл. А 61 К 38/22, опубл. 1996.08.20].

К недостаткам способов следует отнести то, что они не позволяют получить максимальное количество целевого продукта, обладающего достаточной биологической активностью.

Согласно способу, описанному в патенте СССР №1442064, иммуностимулятор получают из тимуса теленка, который измельчают до кашицы, к ней добавляют апиrogenную бидистиллированную воду и в проточном нагревателе осаждают высокомолекулярные составные части 10 мин при 80°C. Затем кашицу охлаждают и центрифугируют. К надосадку добавляют для непрерывной ультрафильтрации апиrogenную воду. Ультрафильтрат подвергают электродиализу 2 ч при 30°C, напряжении 12 В, максимальной силе тока 40 А. Выход экстракта составляет 1,6-1,54% [Патент СССР №1442064, кл. А 61 К 38/22, опубл. 1988.11.30].

Однако полученный таким образом иммуномодулятор не позволяет получить вещество, в котором подфракции с иммуностимулирующим и ингибирующим действием были бы выделены отдельно, и, как показали проведенные авторами исследования, в его составе содержатся компоненты, проявляющие как иммуностимулирующие, так и ингибирующие свойства.

В способе получения иммуностимуляторов, взятом нами за прототип, в качестве сырья, используют вилочковую железу телят 10-15 дневного возраста, из которой подготавливают клеточную массу путем гомогенизации ее в физрастворе и обработки в гомогенизаторе с последующей полной дезинтеграцией оставшихся клеток ультразвуком, из полученного материала далее выделяют полипептиды путем последовательных операций центрифугирования, удаления осадка, нагрева надосадочной жидкости

до +80°C, охлаждения до комнатной температуры с последующим центрифугированием, выдержки полученного супернатанта при минусовой температуре, смешивания его в соотношении 1:5 с охлажденным до минусовой температуры ацетоном с последующим центрифугированием и отделением осадка, растворения осадка при соотношении 1:9-1:10 в 10 мМ растворе фосфорнокислого натрия при pH 7,0-7,2, смешивания в соотношении 4:1 с насыщенным раствором сернокислого аммония с последующим центрифугированием, подкисления полученного супернатанта 10% раствором уксусной кислоты до pH 4,0-4,2, смешивания в соотношении 1:1 с 50% раствором сернокислого аммония с последующим центрифугированием, полного растворения полученного осадка в 10 мМ ТРИС - HCL буфере, при pH - 8,0-8,2, лиофилизации, повторного растворения полученного материала в 10 мМ ТРИС - HCL буфере, пропускания раствора через хроматографическую колонку и лиофилизации (5-я фракция), при этом при центрифугировании поддерживают температуру обрабатываемых материалов от 0 до -4°C.

Полученный после последней лиофилизации материал вновь полностью растворяют в ТРИС-HCL буфере и пропускают через жидкостный хроматограф высокого давления в градиенте метанола 5-55%, выделяя из получаемых подфракций компоненты с иммуностимулирующими и ингибирующими свойствами, после чего суммарные фракции разделяют лиофилизуют.

Выход вещества 5-ой фракции составляет 280 мг на 1 кг сырья. Недостатком способа прототипа является наличие операций, приводящих к значительной потере вещества и соответственно низкому выходу продукта, кроме этого применение ацетона, метанола и солевых ТРИС буферов не позволяет использовать иммуностимулятор в парентеральной терапии больных [Патент РФ 2149006, А 61 К 35/26, опубл. 2000,05,20].

Задача, решаемая настоящим изобретением - повышение выхода иммуностимулятора с высокой биологической активностью, расширение сферы его применения и упрощение процесса.

Поставленная задача решается тем, что в способе получения иммуностимулятора из вилочковой железы телят, включающем подготовку клеточной массы путем измельчения, гомогенизации сырья и последующей дезинтеграции клеток ультразвуком, центрифугирование, обработку полученной надосадочной жидкости сернокислым аммонием, повторное центрифугирование, полученный при этом супернатант подкисляют до pH 4-4,2, далее центрифугируют, образовавшийся осадок растворяют и раствор подвергают хроматографированию с последующей лиофилизацией суммарных фракций продукта, при этом процесс ведут при 4-5°C, а в качестве сырья используют вилочковую железу телят 1-2 месячного возраста, сырье гомогенизируют в дистиллированной воде в течение 5-6 мин при 8000 об/мин гомогенизатора. Обработку сернокислым аммонием ведут из расчета 1:3-3,5 по объему до 50% насыщения, супернатант подкисляют пропусканием углекислого газа, а осадок после подкисления и центрифугирования растворяют в дистиллированной воде до насыщенного состояния раствора, последний пропускают через хроматографическую колонку с сефадексом G-50, уравновешенную дистиллированной водой, при этом все операции центрифугирования ведут в течение не более 15 мин при 3000 об/мин.

Способ получения иммуностимулятора «Тимозина Т» можно представить следующими стадиями:

1. Грубая переработка сырья.
2. Добавление к биомассе дистиллированной воды.
3. Гомогенизация биомассы.
4. Ультразвуковая дезинтеграция клеток.
5. Центрифугирование для удаления оставшихся волокон ткани.
6. Насыщение раствора белков сернокислым аммонием до 50%.
7. Центрифугирование для удаления флотирующих в солевой плотности жира и липопротеидов.
8. Подкисление раствора белков углекислым газом до pH 4,0.

9. Центрифугирование для получения осадка полипептидов.
10. Растворение осадка полипептидов в воде до насыщенного состояния
11. Хроматографическое выделение «Тимозина Т».
12. Контроль активности иммуностимулятора.

5 13. Фильтрация, стерилизация и лиофилизация препарата.
Стадии с 1 по 11 проводятся при температуре не выше +4°C.

Изобретение иллюстрируется фиг.1-5.

На фиг.1 - типичная хроматограмма выделения «Тимозина Т».

10 На фиг.2 показано действие «Тимозина Т» на цитотоксическую активность
моноклеарных клеток периферической крови здоровых доноров к линии опухолевых
клеток K562.

На фиг.3 показано влияние «Тимозина Т» на пролиферативную активность
моноклеарных клеток здоровых доноров.

15 На фиг.4 показано влияние «Тимозина Т» на митогенез моноклеарных клеток
здоровых доноров.

На фиг.5 представлен индекс стимуляции митогенеза «Тимозином Т».

Пример

20 Вилочковые железы тюленей 1-2 месячного возраста в количестве 1 кг пропускали через
электромясорубку. Полученную биомассу смешивали с 3 л дистиллированной воды и
помещали в гомогенизатор на 5 мин при 8000 об/мин. После этого проводили
дизинтеграцию (дробление) клеток, порциями по 100 мл, которые охлаждаются во время
процесса дезинтеграции на ледяной бане, поддерживая температуру 0°C. Дезинтеграцию
проводили на ультразвуковой установке при максимальной ее мощности по 120 с в режиме
100 с воздействия и 20 с перерыва для предупреждения нагрева биомассы, затем
25 проводили центрифугирование при 3000 об/мин 15 мин при +4°C, осадок из остатков
волокон соединительной ткани отбрасывали и получали надосадочную жидкость (НОЖ) 1-ю
фракцию.

30 К НОЖ добавляли сухой сернокислый аммоний до 50% насыщения из расчета 313 г на 1
л НОЖ и вновь проводили центрифугирование при тех же параметрах, и после удаления
флотирующих в солевой плотности жира и липопротеидов, получали 2-ю фракцию. Раствор
полипептидов подкисляли путем пропускания через раствор полипептидов углекислого
газа, до pH=4,0-4,2, с последующим отделением осадка полипептидов
центрифугированием, получали 3-ю фракцию.

35 Осадок растворяли в дистиллированной воде до насыщенного состояния. Раствор
полипептидов подвергали хроматографированию (фиг.1) на колонке с сефадексом G-50
уравновешенной дистиллированной водой, при скорости 8 мл / 15 мин. Хроматограмма
была всегда представлена двумя пиками: 1 пик балластные белки, 2 пик выходил в зоне
рибонуклеазы (масса 13700 Д) это 4-я фракция, представляющий собой «Тимозин Т».

40 Раствор «Тимозина Т» (4-я фракция) в концентрации 1 мг/мл пропускали в стерильных
условиях через фильтр, разливали в стерильные флаконы по 1 мл и подвергали
лиофилизации, закрывали стерильными пробками с дюралевым колпачком. (Фильтрация -
стерилизация проводилась через фильтр Cellulose Acetate 0,2 мкм фирмы Sartorius W
Germany. Флаконы с раствором Тимозина замораживали в жидком азоте, помещали в колбу
лиофильной суши и проводили лиофилизацию при -50°C и вакууме 10 мкм Hg.

45 Выход вещества 4-ой фракции (Тимозина), после хроматографии, по предлагаемому
способу составляет 1000 мг на 1 кг сырья.

50 На фиг.2 представлена диаграмма воздействия «Тимозина Т» и иммуностимулятора,
полученного по способу прототипа «Тимозин Р» на цитотоксическую активность
моноклеарных клеток здоровых доноров к линии опухолевых клеток K562, где виден
примерно одинаковый дозависимый эффект, а при концентрации вещества 100 мкг/мл
эффект нашего препарата выше, чем у прототипа.

На фиг.3 видно, что влияние «Тимозина Т» и препарата прототипа «Тимозина Р» в дозах
от 1 мкг/мл до 100 мкг/мл на пролиферативную активность моноклеарных клеток

здоровых доноров в среднем одинаково.

На фиг.4 и 5 показано влияние «Тимозина Т» и препарата прототипа «Тимозина Р» на митогенез и индекс стимуляции митогенеза мононуклеарных клеток здоровых доноров, где видно, что в дозе 100 мкг/мл эффект нашего препарата превосходит действие прототипа.

Также в таблицах 1-3 представлены данные по эффективности действия «Тимозина Т».

Таблица 1			
Действие «Тимозина Т» на цитотоксическую активность мононуклеарных клеток здоровых доноров к линии опухолевых клеток К562.			
Концентрация препарата	Уровень цито токсичности %		
	Тимозин Т	Тимозин Р	МНК
100	91,0±5,2*	82,2±5,3*	
10	73	83	
1	77	83	24,4±3,97
0,1	82	82	
0,01	30	27	

Таблица 2			
Влияние «Тимозина Т» на пролиферативную активность и митогенез мононуклеарных клеток здоровых доноров». (№15)			
Препарат	Концентрация	Властные формы, у.е.	Индекс стимуляции
Контроль	-	0,095±0,02	-
Тимозин Т	100	0,773	8,1
	10	0,595	6,2
	1	0,5	5,3
	0,1	0,571	6,0
Тимозин Р	100	0,7	7,8
	10	0,765	8,0
	1	0,462	4,9
	0,1	0,529	5,6

Таблица 3			
Влияние «Тимозина Т» на пролиферативную активность мононуклеарных клеток здоровых доноров			
Препарат	Концентрация	Бластные формы, у.е.	Жизнеспособные клетки
Контроль	-	3,4±0,7	98,0±0,5
Тимозин Т	100	97,5±5,2*	98,0
	10	98	97
	1	97	97
	0,1	32,2	98
Тимозин Р	100	98,5	97
	10	100	98
	1	100	98
	0,1	85	97

Как следует из результатов тестовых испытаний иммуностимулятор, полученный по предлагаемому способу, обладает более высокой активностью с дозозависимым эффектом, чем препарат, выделенный по способу-прототипу.

Таким образом, предлагаемый способ по сравнению с известным, за счет изменения технологической цепочки, позволяет выделять до 1000 мг иммуностимулятора из 1 кг сырья (при 280 мг по способу-прототипу) с более высокой биологической активностью. В результате исключения из способа получения «Тимозина Т» органических растворителей ацетона, метанола и ТРИС солевых буферных растворов возможно использование «Тимозина Т» в парентеральном лечении больных.

Формула изобретения

1. Способ получения иммуностимулятора из вилочковой железы телят, включающий подготовку клеточной массы путем измельчения, гомогенизации сырья и последующей дезинтеграции клеток ультразвуком, центрифугирование, обработку полученной надосадочной жидкости сернокислым аммонием, повторное центрифугирование, полученный при этом супернатант подкисляют до pH 4-4,2, далее центрифугируют, образовавшийся осадок растворяют и раствор подвергают хроматографированию с последующей лиофилизацией фракции продукта, при этом центрифугирование ведут при

охлаждении, отличающийся тем, что в качестве сырья используют вилочковую железу тюленя 1-2-месячного возраста, сырье гомогенизируют в дистиллированной воде в течение 5-6 мин при 8000 об/мин гомогенизатора, дезинтеграцию клеток ультразвуком проводят на льду порциями по 100 мл по 120 с в режиме 100 с воздействия и 20 с перерыва,

- 5 обработку сернокислым аммонием надосадочной жидкости ведут из расчета 1:3-3,5 по объему до 50% насыщения, супернатант подкисляют пропусканием углекислого газа, а осадок после подкисления и центрифугирования растворяют в дистиллированной воде до насыщенного состояния раствора, последний пропускают через хроматографическую колонку с сефадексом G-50, уравновешенную дистиллированной водой, полученный
- 10 раствор перед лиофилизацией подвергают фильтрации и стерилизации, при этом все операции центрифугирования ведут в течение не более 15 мин при 3000 об/мин, при температуре не выше 4-5°C, а дезинтеграцию клеток при 0°C.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что дезинтеграцию клеток ведут при максимальной мощности ультразвуковой установки.

15

20

25

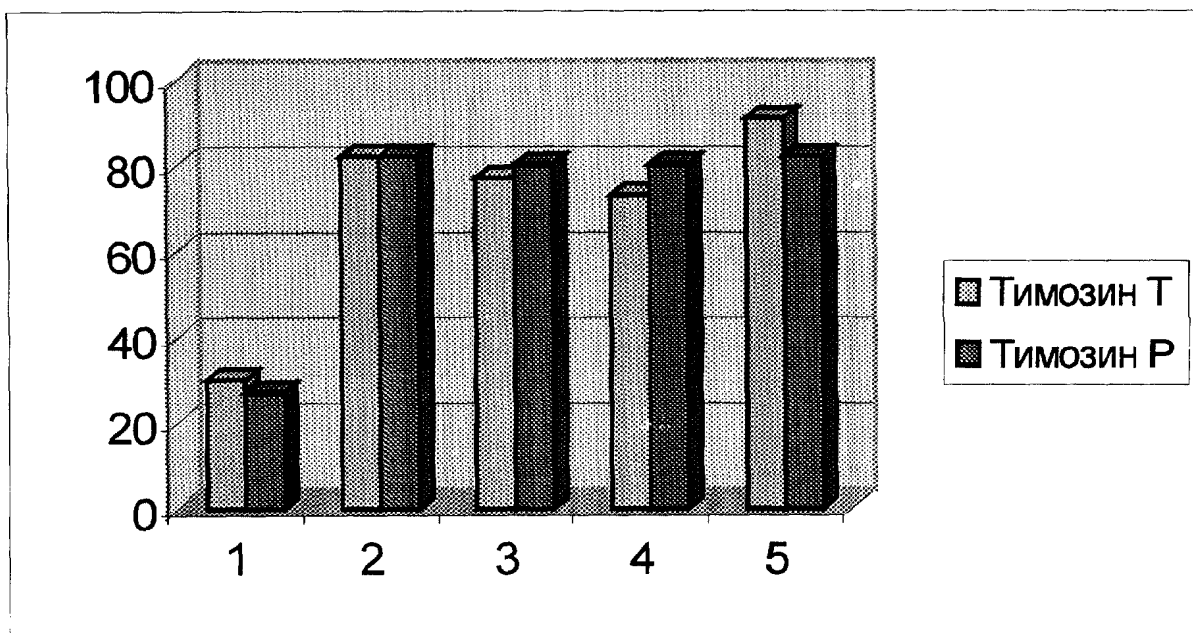
30

35

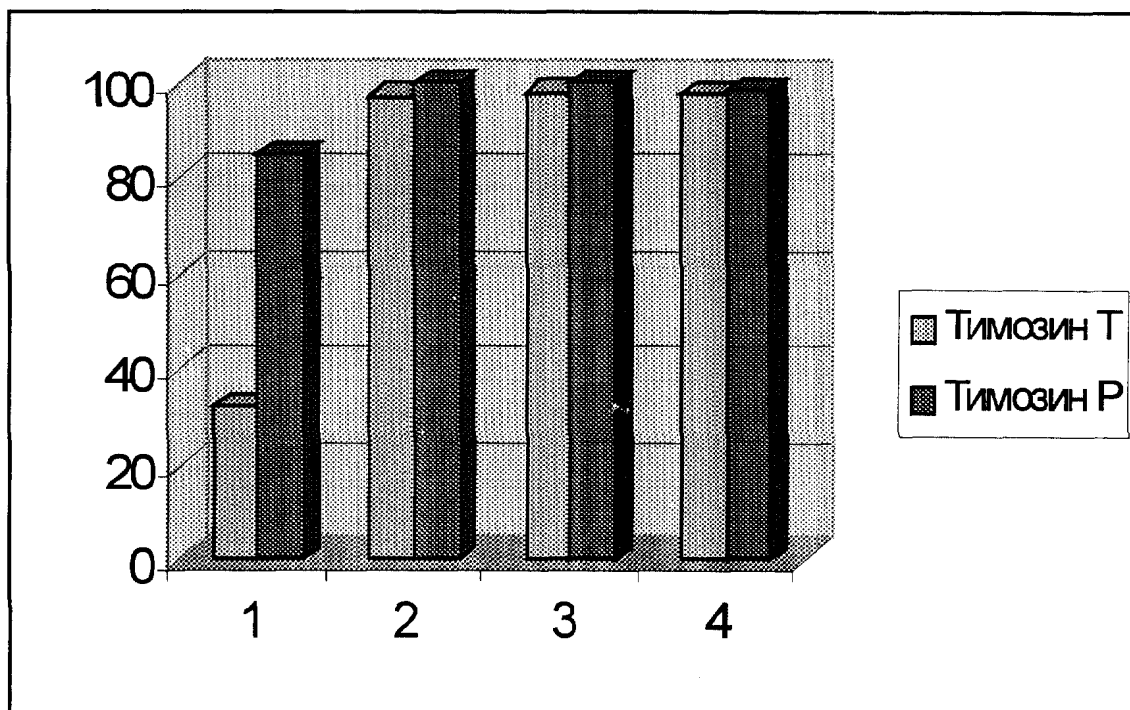
40

45

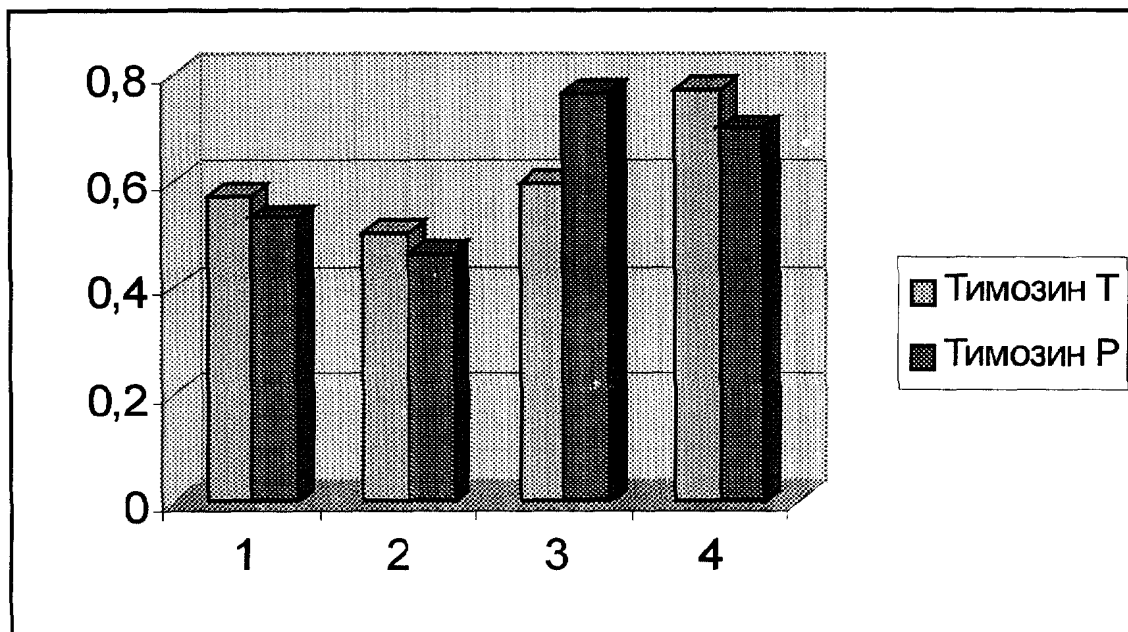
50



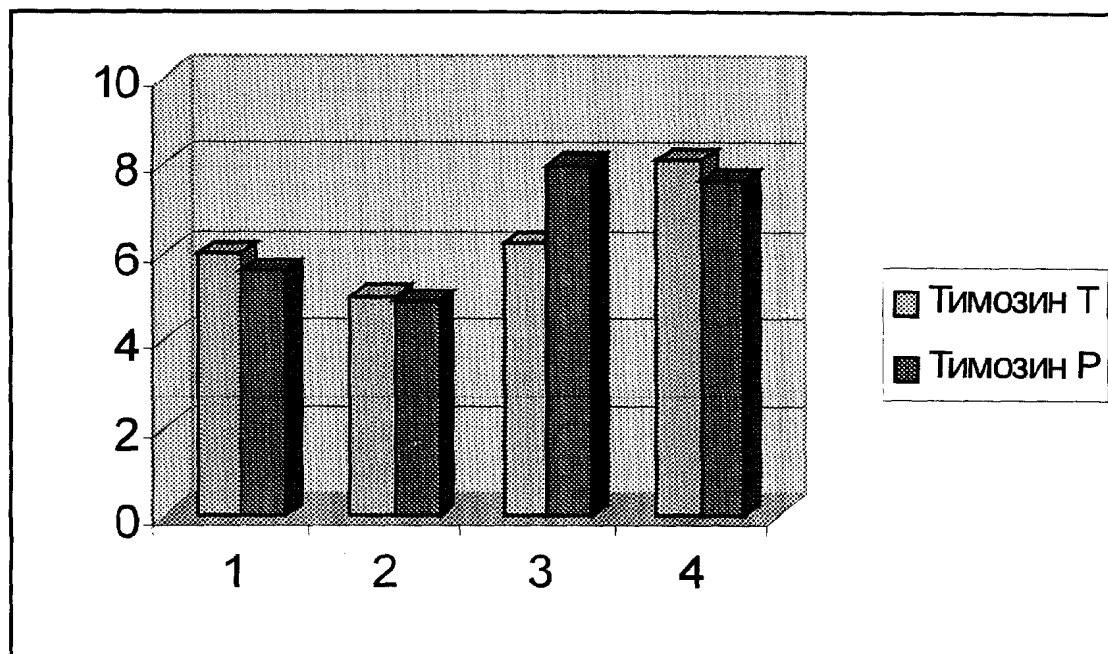
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5